

00/3545

PCT / P 0 0 / 0 1 2 1 4

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP00/1214

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 20 JUN 2000	
WIPO	PCT

Bescheinigung

Herr Dr. Kilian H e n n e s in Konstanz/Deutschland hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Verfahren zum Darstellen von biologisch aktivierten
ferromagnetischen Partikeln sowie Vorrichtung dafür"

am 18. August 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht und erklärt,
dass er dafür die Innere Priorität der Anmeldung in der Bundesrepublik Deutschland
vom 17. Februar 1999, Aktenzeichen 199 06 352.4, in Anspruch nimmt.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
G 01 N 33/543 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 30. Mai 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 39 208.0

HIEBSCH PEEGE BEHRMANN

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS

Antrag auf Erteilung eines Patents

Unser Zeichen: **H264DE2**
H/mü

(31) **Prioritätsnummer / Priority Application Number:**

(32) **Prioritätstag / Priority Date:**

(33) **Prioritätsland / Priority Country:**

(54) **Titel / Title:**

**Verfahren zum Darstellen von biologisch
aktivierten ferromagnetischen Partikeln sowie
Vorrichtung dafür.**

(71) **Anmelder/in / Applicant:**

**Dr. Kilian Hennes
Blarerstraße 56
D-78462 Konstanz**

Erfinder / Inventor:

-ist der Anmelder-

(74) **Vertreter / Agent:**

**Dipl.-Ing. Gerhard F. Hiebsch
Dipl.-Ing. Dr. oec. Niels Behrmann M.B.A. (NY)
Heinrich-Weber-Platz 1
78224 Singen**

Verfahren zum Darstellen von biologisch aktivierten ferromagnetischen Partikeln sowie Vorrichtung dafür

Die Erfindung betrifft ein Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten ferromagnetischen Partikeln. Zudem betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zum Nachweis und Zählen von suspendierten biologischen Mikropartikeln in flüssigen Proben, insbesondere zum Durchführen des genannten Verfahrens.

Das Zählen von Bakterien, Blutzellen oder Zellbestandteilen in wässrigen Lösungen erfolgt bisher mittels Durchflussszytometer oder Coultercounter. Hier werden die entsprechenden Partikel gefärbt und anhand von optischen Signalen identifiziert oder durch kapazitive Messungen gezählt.

In Kenntnis dieser Gegebenheiten hat sich der Erfinder das Ziel gesetzt, derartige Messungen zu vereinfachen.

Zur Lösung dieser Aufgabe führt die Lehre des unabhängigen Anspruches; die Unteransprüche geben günstige Weiterbildungen an. Zudem fallen in den Rahmen der Erfindung alle Kombinationen aus zumindest zwei der in der Beschreibung, der Zeichnung und/oder den Ansprüchen offenbarten Merkmalen.

Erfindungsgemäß werden monovalente primäre Antikörper mit ferromagnetischen Partikeln in mehrfachem Überschuss gemischt, welche mit sekundären Antikörpern beschichtet sind; anschließend werden mittels partieller Sedimentation in einer Zentrifuge aggregierte Partikel abgetrennt, die aus einem monovalenten primären Antikörper und antikörperbeschichteten ferromagnetischen Teilpartikeln bestehen. Anstelle primärer Antikörper können auch Viren oder Gensonden verwendet werden, gegen deren Hüllproteine bzw. Spacer-moleküle die sekundären Antikörper gerichtet sind.

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung können die biologischen Partikel immunologisch, phagologisch oder molekularbiologisch mit Partikeln verbunden werden, die beim anschließenden Durchströmen einer Metallspule messbare und zählbare Induktivitätsänderungen auslösen.

Auch hat es sich als günstig erwiesen, induktivitätsändernde, ferromagnetische Partikel vor dem Durchströmen der Metallspule mittels Elektromagnet in einer Kunststoffkapillare festzuhalten und dort mit den in die Kapillare einströmenden biologischen Mikropartikeln zu verbinden, während die Probe, in welcher diese enthalten waren, aus der Kapillare herausgeführt wird. Zudem sollen durch die Metallspule als Teil eines elektronischen Schwingkreises zählbare Änderungen der Eigenschwingfrequenz erzeugt werden.

Um den apparativen Aufwand bei der optischen Messung zu umgehen und eine höhere Spezifität gegenüber der kapazitiven Messung zu erreichen, wird also für den Nachweis des einzelnen Partikels ein geändertes Messprinzip eingesetzt: Die Messung der Induktivitätsänderung einer Mikrospule aus Metall. Da biologische Partikel aber eine Permeabilitätskonstante μ von annähernd 1 haben, müssen diese zum Nachweis und zur Zählung mittels Spule zuvor mit induktivitätsändernden Substanzen markiert werden. Diese Markierung geschieht durch die immunologische, phagologische oder molekularbiologische Ankopplung von ferromagnetischen Partikeln, welche monovalent entweder mit Antikörpern, mit Virus-Andockmolekülen oder mit Gensonden an Spacermolekülen verbunden sind.

Die Ankopplung der ferromagnetischen Marker geschieht in einer Vorrichtung, welche gleichzeitig eine Anreicherung der zu zählenden Partikel ermöglicht: Die Marker werden in einer Teflonkapillare mittels eines Elektromagneten als Sorptions-Schicht festgehalten, bis die gesamte Probe in die Kapillare gepumpt wurde und gleichzeitig die überschüs-

sige Probe aus der Kapillare herausgelaufen ist. Hierauf wird der Magnet ausgeschaltet, damit die Marker frei diffundieren und die Oberfläche der biologischen Partikel sättigen können. Darauf wird der Kapillaren-Inhalt mit einer piezoelektrischen Pumpe durch eine Metallspule gepumpt, die als Spirale auf eine Leiterplatte geätzt wurde und mit Kondensator und Widerstand als Schwingkreis geschaltet ist. Der Schwingkreis wird mit einer Frequenz angeregt, die derjenigen Eigenschwingfrequenz entspricht, welche generiert wird, wenn sich ein durchschnittlich markierter biologischer Mikropartikel in der Spule befindet. Dadurch entsteht im Schwingkreis immer dann eine Resonanzschwingung, wenn ein entsprechender Mikropartikel durch die Spule tritt.

Ein Beispiel für die Anwendung dieses Verfahrens ist der Nachweis von Kolibakterien in Wasserproben. Hierzu werden monovalente primäre E.-coli-spezifische Antikörper mit an magnetische Beads gekoppelten sekundären Antikörpern konjugiert. Die Suspension dieser Konjugate wird in die Teflon-Kapillare gepumpt und mittels Elektromagnet dort fixiert. Beim Durchströmen der Kapillare mit der zu untersuchenden Wasserprobe werden Kolibakterien über die primären Antikörper an den Konjugaten festgehalten. Nach dem Abschalten des Magneten kann die Suspension von magnetisch markierten Kolibakterien durch die Messspule gepumpt werden. Die Anzahl der Resonanz-Ereignisse im angeschlossenen Schwingkreis entspricht der Anzahl der Kolibakterien in der ursprünglichen Wasserprobe. Durch den Einsatz dieses Gerätes und der entsprechenden Konjugate ist es möglich, ohne den aufwendigen Einsatz der Durchflusszytometrie Bakterien automatisch zu zählen. Des weiteren ist es möglich, mit dieser Messmethode eine Miniaturisierung des Nachweisgerätes zu erreichen.

Mit der beschriebenen Technik werden Partikel wie Bakterien, Zellen oder Zellbestandteile in wässrigen Lösungen nachgewiesen und gezählt. Diese Technik ermöglicht eine Miniaturisierung des automatischen Partikelzählverfahrens. Dazu werden die Partikel vor der Messung durch die Reaktion mit monovalenten antikörper- bzw. virenbeschichteten ferromagnetischen Partikeln markiert. Die induktive Messung beruht auf dem Passieren der mit den biologischen Partikeln aggregierten ferromagnetischen Partikel durch die Mikrospule eines elektronischen Schwingkreises. Die beim Passieren auftretenden Resonanzereignisse werden gezählt.

Die Vorrichtung kann in der Medizin, Mikrobiologie und Hygiene eingesetzt werden, beispielsweise zum Auszählen von Blutzellen; es können ökologisch relevante Mikroorganismen ausgezählt oder krankheitserregende Keime nachgewiesen werden.

Weitere Vorteile, Merkmale und Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung eines bevorzugten Ausführungsbeispiels sowie anhand der Zeichnung; diese zeigt in

Fig. 1: ein Schema zu einem erfindungsgemäßen Verfahren;

Fig. 2: ein Detail der Fig. 1 in schematisierter Schrägsicht.

Vor einem Verfahren zum Nachweis von Kolibakterien in einer durch eine Leitung 10 zugeführten Wasserprobe Z werden monovalente primäre E.-coli-spezifische Antikörper mit an magnetische Beads gekoppelten sekundären Antikörpern konjugiert. Die Leitung für die monovalenten magnetischen Partikel F ist mit 12 bezeichnet. Beide Leitungen 10, 12 enthalten Schlauchpumpen 14 und vereinigen sich nach diesen zu einer gemeinsamen Förderleitung 16.

Das Reagenz mit ferromagnetischen, biologisch aktivierten Partikeln wird über die Leitungen 12 und 16 in eine Teflonkapillare 20 gepumpt und dort mittels eines Elektromagneten 22 fixiert, dessen Magnetspule mit 24 bezeichnet und dem die Z-förmig aufgewickelte Teflonkapillare 20 in einem konzentrischen Polschuh 26 zugeordnet ist. Dieser begrenzt mit einem von ihm in Radialabstand umgebenen Polstift 28 einen Ringraum 30 für die Teflonkapillare.

Beim Durchströmen der Kapillare 20 mit der zu untersuchenden Wasserprobe Z werden Kolibakterien als zu zählende biologische Partikel über die primären Antikörper an den ferromagnetischen Konjugaten festgehalten. Nach dem Abschalten des Elektromagneten 22 kann die Suspension von magnetisch markierten Kolibakterien dank einer Piezopumpe 32 in einer Messleitung 34 durch eine geätzte Metallspule als Messspule 36 einer mikrosystemtechnischen Einheit 40 transportiert

werden. Aus dieser werden die gezählten Partikel in Pfeilrichtung X ausgetragen.

Die freien Enden 38, 38_a der Messspule 36 sind -- nach einem Widerstand 42 und einem Kondensator 44 -- an eine Einrichtung 46 zum Anregen der Schwingung und zum Messen von Resonanzereignissen angeschlossen; dort erfolgt eine Umwandlung in Zählimpulse.

Die Anzahl der Resonanzereignisse im angeschlossenen Schwingkreis entspricht der Anzahl der Kolibakterien in der ursprünglichen Wasserprobe Z.

Zwischen der Teflonkapillare 20 und der Piezopumpe 32 ist ein -- ein Ventil 48 enthaltender -- Leitungsabzweig 18 für überschüssige Probeanteile Q vorgesehen, dem in der Förderleitung 16 ein Ventil 48 nachgeschaltet ist.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten ferromagnetischen Partikeln,

dadurch gekennzeichnet,

dass monovalente primäre Antikörper mit ferromagnetischen Partikeln im Überschuss gemischt werden, welche mit sekundären Antikörpern beschichtet sind, und anschließend mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt werden, die aus einem monovalenten primären Antikörper und antikörper-beschichteten ferromagnetischen Teilpartikeln bestehen.
2. Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten ferromagnetischen Partikeln, dadurch gekennzeichnet, dass Viren mit ferromagnetischen Partikeln im Überschuss gemischt werden, welche mit gegen die Hüllproteine der Viren gerichteten Antikörpern beschichtet sind, und anschließend mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt werden, die aus einem Virus und antikörper-beschichteten ferromagnetischen Teilpartikeln bestehen.
3. Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten ferromagnetischen Partikeln, dadurch gekennzeichnet, dass spacermolekül-gekoppelte Oligonukleotid-Gen-sonden mit ferromagnetischen Partikeln im Überschuss gemischt werden, welche mit gegen die Spacermoleküle gerichteten Antikörpern beschichtet sind, und anschließend mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt werden, die aus einer Gen-sonde und antikörper-beschichteten ferromagnetischen Teilpartikeln bestehen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die biologischen Partikel immunologisch, phagologisch oder molekularbiologisch mit Partikeln verbunden werden, die als Marker beim anschließenden Durchströmen einer Metallspule meßbare und zählbare Induktivitätsänderungen auslösen.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass induktivitätsändernde, ferromagnetische Partikel vor dem Durchströmen der Metallspule mittels Elektromagnet in einer Kunststoffkapillare festgehalten und dort mit den in die Kapillare einströmenden biologischen Mikropartikeln verbunden werden, während die sie enthaltende Probe aus der Kapillare herausgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Metallspule als Teil eines elektronischen Schwingkreises beim Durchströmen der induktivitätsändernden Partikel zählbare Änderungen der Eigenschwingfrequenz erzeugt werden.
7. Vorrichtung zum Nachweis und Zählen für suspendierte biologische Mikropartikel in flüssigen Proben, insbesondere Vorrichtung zum Durchführen der Verfahren nach wenigstens einem der voraufgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Förderleitung (16) für eine zu messende Probe als Messleitung (34) von einer Metallspule als Messspule (36) umgeben und diese an eine Einrichtung (46) zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen angeschlossen ist.
8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Förderleitung (16) an eine Einrichtung mit Kapillaren (20), insbesondere Teflonkapillaren, angeschlossen ist sowie letztere einem Elektromagneten (22) zugeordnet sind.

9. Vorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare/n (20) in einem von einem Polschuh (24) umgebenen Raum (30) angeordnet sind.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den Elektromagneten (22) und einem Ventil (48) der Förderleitung (16) eine Zweigleitung (18) für überschüssige Proben (Q) angeordnet ist.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Einrichtung (46) zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen zur Metallspule (36) hin wenigstens ein Widerstand (42) und ein Kondensator (44) vorgeordnet sind.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Messspule (36) mit vorgeordneter Piezopumpe (32) und nachgeordnetem Widerstand (42) bzw. Kondensator (44) Teile einer mikrosystemtechnischen Einheit (40) sind.

Fig. 2

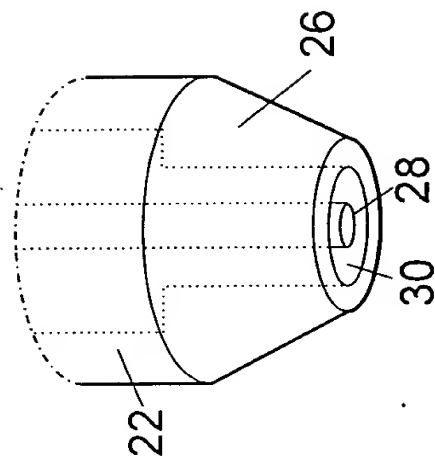


Fig. 1

